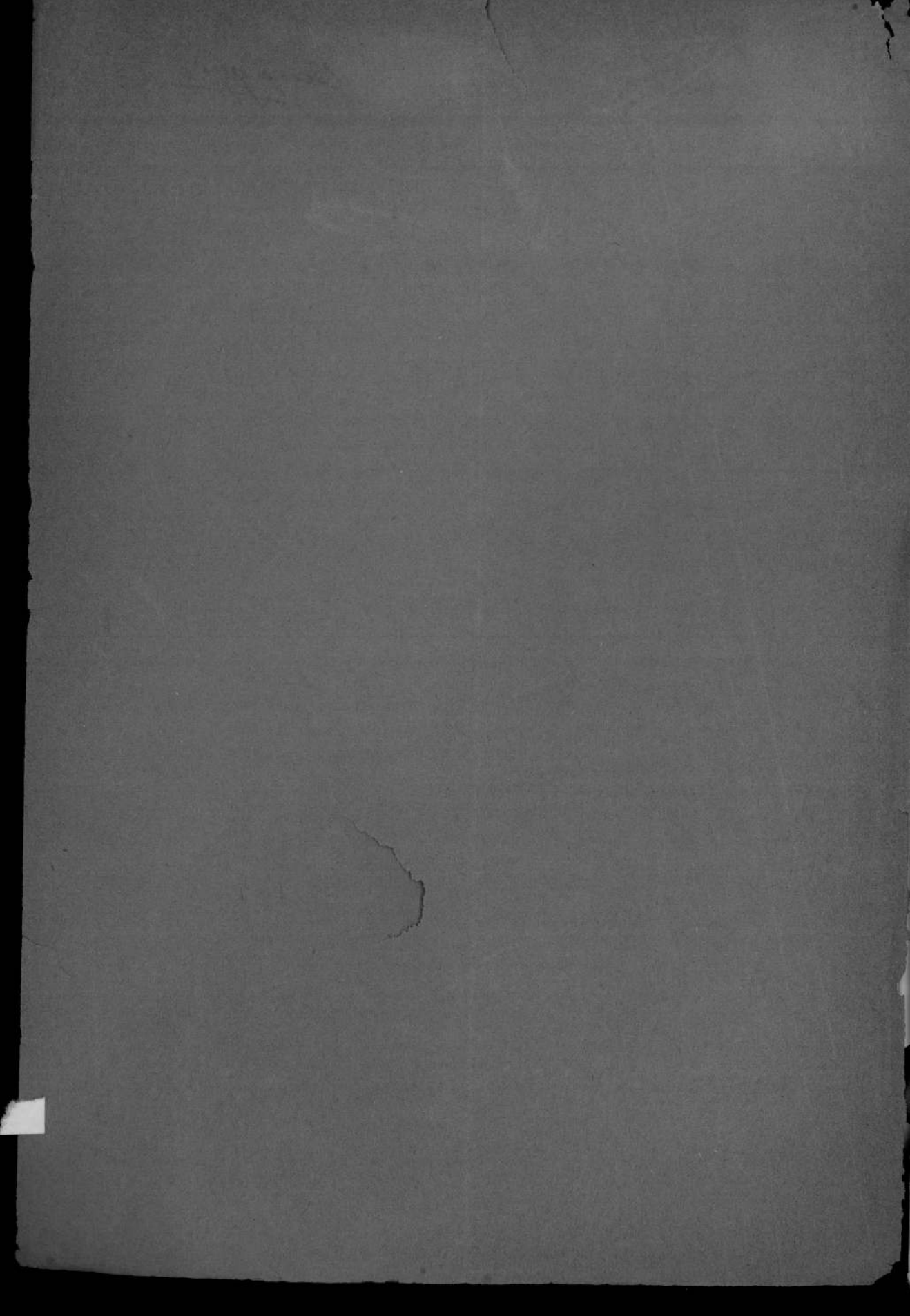




*Il maggio*  
*1899*

*Misc. B. 47. 32*





# Valore pratico della reazione del Glicogene nelle carni fresche ed insaccate

pel Dott. C. TONZIG

AIUTO NELL'ISTITUTO D'IGIENE NELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA

Le vigenti leggi permettono lo smercio della carne equina purchè esso venga effettuato in appositi spacci. In tal modo, chi è addetto alla sorveglianza igienica degli alimenti, può con facilità compiere il suo ufficio, specialmente per impedire che sia venduta per carne di bue la carne di cavallo, che deplorabilmente è ancora troppo poco stimata dai consumatori.

Ma in alcune città, come Padova, mancano tali appositi spacci. Ciò però non toglie che, dei tanti cavalli i quali vengono annualmente a morire nel comune, solo un numero irrisorio venga presentato all'Ispettore del Macello il quale li destina alla sardigna. Quindi è logico ammettere che in questa città, come in molte altre, la carne di cavallo sia consumata o per la fabbricazione di carni insaccate, o fresca, sempre con frode verso i compratori, e, ciò che è più grave, senza la previa visita sanitaria, la qual cosa può costituire un pericolo dal punto di vista puramente igienico.

Infatti non si può ammettere che la carne, così clandestinamente destinata alla alimentazione dei cittadini provenga da animali i quali, come avviene in altri siti, sieno stati macellati opportunamente dopo riposo e nutrizione adatta. Senza dubbio essa proviene da cavalli che, o per vecchiaia o per malattia, si sono mostrati inabili a qualunque lavoro, oppure, nei casi più favorevoli da cavalli colpiti da traumi che ne resero necessario l'abbattimento.



Quindi in ogni luogo abitato, ma specialmente nelle città che si trovano in queste condizioni, riuscirebbe di somma importanza il poter riconoscere sicuramente, con prove di laboratorio, la carne equina fresca, o la presenza di essa nelle carni conservate.

Gli studi fatti finora in proposito sono abbastanza numerosi, e quantunque dal complesso di essi si possa concludere per una certa sicurezza delle prove proposte, noi vediamo che, nei laboratori d'Igiene, queste non godono la fiducia che, secondo i loro proponenti, dovrebbero godere, e l'igienista, quando vuol essere sicuro della frode, si lascia perciò più volentieri guidare da criteri di polizia che dalla ricerca chimica o microscopica.

Da che dipende tale sfiducia dei pratici nelle prove che finora sono state indicate? Dipende da difficoltà di ricerca oppure da poca esattezza del principio su cui le prove stesse sono fondate?

Primi tra gli autori che finora si sono occupati dell'argomento, Bräutigam ed Edelmann (1), considerando che il glicogene, oltrechè nel fegato e nei tessuti fetali, si riscontra nei muscoli dei cavalli ed in generale dei solipedi, più abbondantemente e costantemente che non in quelli degli altri animali, e che esso, solubile a freddo, si scioglie più facilmente a caldo, e fondandosi sul fatto che le soluzioni di glicogene acquistano in presenza dell'iodio un colore speciale, mettono a cuocere, per qualche ora, 50 gr. di carne con 100 cc. di acqua e dopo raffreddato e filtrato precipitano con acido nitrico gli albuminoidi del brodo. Nel liquido limpido, ottenuto colla filtrazione lasciano cadere acqua di iodio saturata a caldo, e ottengono nel caso di carne di cavallo, il colorito rosso bruno caratteristico.

---

(1) Bräutigam ed Edelmann — *Der chemische Nachweis von Pferdefleisch* — *Pharm. Centralhalle* (35 Bod., S. 68-69). Dall' *Hygienische Rundschau*, 1894, N. 6, S. 324.

Nocard (1) in seguito conferma l'esperimento di Bräutigam ed Edelmann e per evitare che la presenza di amido, nel caso di salciccie, possa produrre errori, fa della carne un infuso a freddo che, filtrato, fa poi bollire, ed al quale, dopo precipitazione degli albuminoidi con acido nitrico, aggiunge la soluzione di iodio.

Courtoy e Corremans (2) ripetendo la prova anche in confronto con altre carni, affermano che la carne di bue non dà reazione.

Niebel (3) più tardi con ricerche quantitative, ammette invece che la carne di cavallo contenga realmente una quantità di glicogene maggiore che le altre carni, nelle quali quindi non lo esclude.

E pur non escludendolo in altre carni, il Cugini (4) alla sua volta crede sufficiente in pratica il metodo di Bräutigam ed Edelmann, specialmente per la ricerca della carne equina nelle salsiccie, quando si segua la modificazione da lui proposta.

Questa consiste nel macerare prima la carne nell'acqua fredda per 12 ore e poi riscaldarla lentamente fino all'ebollizione per quindi aggiungere al liquido decantato ed eventualmente filtrato un egual volume di alcool, che dà luogo ad un copioso sedimento, il quale raccolto su filtro, lavato con alcool e di questo poi privato, viene trattato con piccola quantità di acqua calda nella quale infine si prova la nota reazione del glicogene.

---

(1) Nocard — *De l'emploi de la viande de cheval dans certain saucisson* — *Annales d'Hygiène publique* 1895, N. 5, p. 289.

(2) Courtoy e Corremans — *Zeitschrift Fleisch und Milchhyg.* 1895 N. 5, S. 133. (Citato nel lavoro del Cugini di cui alla Nota N. 5).

(3) W. Niebel — — *Recherche de la viande de cheval* — *Zeitschrift Fleisch und Milchhyg.* 1898). Dal *Journal de Ph. et de Chimie* 1898, Tomo VIII, S. 140.

(4) Cugini G. — *Sul processo di Courtoy e Corremans per riconoscere la carne di cavallo* — *Le Stazioni sperimentali agrarie italiane*, 1898, Vol. XXXI, pag. 139-142.

Battelli (1) nel 1898 pubblicò uno studio critico sui metodi fino allora in uso per differenziare la carne di cavallo da quella di maiale e di bue e confermando che l'esame microscopico, comunque fatto, sia da passare in seconda linea, dopo molte ricerche sperimentali, finisce per ritenere come sicuro il metodo della rivelazione del glicogene coll'iodio.

Egli esclude, mediante prove di confronto, che la reazione del glicogene si possa avere con altre carni che non siano quelle di cavallo e riconosce che la reazione della carne fresca scompare dopo pochi giorni, come scompare al massimo dopo 9 giorni nelle salsiccie confezionate colla carne stessa. Secondo l'autore questo fatto dipenderebbe dalla idratazione del glicogene dovuta alla acidità della carne.

Ferdinand Jeann (2) nel 1899 modifica alquanto il metodo di ricerca ritenuto oramai sicuro, nel senso che aggiunge l'iodio non al brodo di carne ma alla soluzione acquosa del glicogene ottenuto mediante la precipitazione coll'alcool e 96°.

Bastien (3) nello stesso anno, riprende l'argomento e con metodo semplificato, assicura che nelle salsiccie è facile scoprire la presenza di carne di cavallo anche se vi si trova in tenui proporzioni (5‰), e propone il trattamento dell'infuso con acido acetico per evitare che l'amido eventualmente contenuto possa dare reazione coll'iodio.

Più tardi lo stesso autore (4) coll'istesso metodo, ot-

---

(1) Battelli — *Sulla differenza fra le carni di cavallo e quelle di bue fresche e conservate* — *Annali d'Igiene sperimentale*, 1898, pag. 222.

(2) Ferdinand Jean — *Ueber den Nachweis von Pferdefleisch in Würsten*, *Annal. chim. anal.*, 1899, N. 4, S. 81-82. Dal *Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahr. u. Genussmittel*, 1900, S. 31.

(3) Ph. Bastien — *Sur la recherche de la viande de cheval dans les saucisson* — *Journal de Ph. et de Chimie*, 1898, T. 7, pag. 540.

(4) Lo stesso — *Sur la recherche de la viande de cheval* — Lo stesso giornale, 1899, T. 9, pag. 54.

tenne la reazione in tutte le carni dei solipedi mentre nei buoi la riscontrò solo in grado leggero ed in determinati muscoli.

Da quanto si può concludere dai lavori da me finora citati è chiaro che la prova del glicogene messo in evidenza coll'iodio dovrebbe, secondo alcuni, essere sicura e non resterebbe ai pratici che di applicarla nei singoli casi sospetti; ad altri essa non ispira tale fiducia, sia perchè pare si abbia con altre carni che non siano quelle di cavallo, sia perchè non è ancora ben precisata la sua durata nelle carni insaccate.

Per questa disparità di opinioni e di fede, ho creduto di tornare anch'io su tale argomento importante, per contribuire ad assodare:

1.° Se la reazione del glicogene coll'iodio sia veramente sicura per la scoperta della carne di cavallo, e fino a quando si può trovarla nelle carni insaccate e quali condizioni vengono in esse a farla scomparire.

2.° Se eventualmente essa manchi e per quali cause in detta carne.

3.° Se ed in quali circostanze essa può essere data dalla carne di altri animali usate per alimento fresche o nella salciccia.

. . .

Tenendo presente la metodica seguita dai diversi autori innanzi ricordati e quindi le modificazioni da alcuni di essi addotte al metodo primitivo di Bräutigam ed Edelmann e le ragioni di tali modificazioni, io ho proceduto nelle mie ricerche col metodo seguente:

Pestata la carne dopo di averne asportati i tendini e le parti grasse, ovvero la pasta delle salciccie dopo averne allontanati quei pezzetti che si riconoscono non essere sostanza muscolare (grasso, cotenna, grani di pepe ed altre droghe), si metteva la poltiglia risultante nel triplo o

quintuplo del suo volume di acqua; e per questo non è necessario ricorrere a grandi quantità bastando pochi grammi di carne.

Essendo necessario che la reazione del miscuglio sia nettamente alcalina, avendosi in caso contrario, facilmente la scomposizione del glicogene, io ho sempre alcalinizzato il miscuglio risultante con soluzione di potassa al 20% fino a netta reazione alcalina, preferendo tale procedimento a quello della maggior parte dei precedenti autori, i quali invece hanno fatto cuocere la poltiglia in una soluzione di potassa all'1 o 2%.

Ad evitare l'inconveniente della formazione di spuma o della adesione delle albumine della carne alle pareti del recipiente, ho trovata migliore la pratica di procedere alla cottura a bagno maria.

Raffreddato dopo cottura il miscuglio, ho filtrato per filtro bagnato, ripetendo la filtrazione, quando, come spesso avviene, il filtrato si presentava torbido.

Questo è già sufficiente per ottenere che, alle prime gocce della soluzione di iodio versata in pochi cc. del liquido posto in un tubo da saggio si abbia la caratteristica reazione del glicogene colla comparsa del colore rosso bruno talvolta violaceo o tendente all'azzurro. Ma per ottenere la reazione in modo più evidente, rapido e persistente, ho preferito anch'io, la maggior parte delle volte, di precipitare nel filtrato gli albuminoidi o coll'acido nitrico concentrato o col *reattivo di Mayer* (soluzione neutra di ioduro di potassio e mercurio) previa acidificazione con acido cloridrico.

Tanto nell'uno come nell'altro caso, la mancanza della reazione a caldo e lo scomparire col riscaldamento per ricomparire col raffreddamento, quand'essa si verificava, mi toglievano ogni dubbio.

\* \* \*

In una prima serie di esperimenti mi sono proposto di stabilire se nella carne di cavallo la reazione sia costante anche in rapporto alle varie cause della morte sapendosi già dalla fisiologia che il quantitativo di glicogene è influenzato da vari stati dell'organismo come il lavoro muscolare, l'inanizione etc. Per studiare ciò mi sono procurato pezzi di carne di cavallo destinato alla sardigna e che devo alla gentilezza del Dott. Furlan veterinario ispettore al Civico macello. Su ciascuno di questi ho praticata la prova del glicogene ed eccone i risultati:

1.° Cavallo morto per adenite da *streptococcus equi*  
— *Reazione poco marcata.*

2.° Cavallo abbattuto perchè affetto da *morva* (l'accertamento della diagnosi venne fatto batteriologicamente ed all'autopsia) — *Reazione evidentissima.*

3.° Cavallo abbattuto perchè inabile al lavoro per vecchiaia — *Reazione poco marcata.*

4.° Cavallo abbattuto in seguito a grave lesione traumatica — *Reazione evidente.*

5.° Cavallo abbattuto per l'istessa ragione — *Reazione poco marcata.*

6.° Cavallo stallone affetto da *pielonefrite* e morto per scoppio di una *ectasia aortica* — *Reazione evidente.*

Quindi possiamo concludere che la reazione si presenta sempre nella carne equina, indipendentemente dalla causa di morte, sebbene in grado non sempre eguale.

\* \* \*

Ora data la sicurezza della sua presenza nella carne di cavallo fresca, si dimostra essa costantemente nelle salsiccie che tale carne contengono?

Per provare ciò, io ho fatto fare salsiccie coi metodi

comunemente in uso adoperando pasta confezionata con miscuglio di carne di cavallo e carne di maiale. Queste in una prima serie, si trovavano fra di loro rispettivamente nelle seguenti proporzioni: Tutto cavallo; 1:1; 1:2; 1:3; 1:9.

In una seconda: tutto cavallo; 1:2; 1:5; 1:10.

In una terza: 1:1.

Per controllo ho fatto anche fare salsiccie di pura carne di maiale e salsiccie di un miscuglio di carne di maiale e di bue che non dava reazione del glicogene.

Le salsiccie così confezionate pesavano da fresche circa 100 grammi ciascuna e vennero mantenute in un sito fresco ed asciutto, opportuno per la loro conservazione.

Ogni tanti giorni una di esse veniva esaminata insieme ad una di controllo per ricercare la reazione del glicogene col metodo che più innanzi ho descritto.

Mentre le salsiccie di controllo non diedero mai reazione, in quelle che contenevano carne di cavallo, e che non presentavano segni di alterazione, come ammuflimento irraucidimento, putrefazione, la reazione fu evidente fino a 30 giorni dopo la fabbricazione in quelli della prima serie, fino a 50 giorni in quelle della seconda e fino a 55 giorni in quelle della terza.

Cogli esami ripetuti ulteriormente nelle stesse salsiccie non mi è stato più possibile di mettere in evidenza la reazione.

È interessante il fatto che la reazione si mostra presso a poco nell'istessa intensità così nei salami contenenti le varie proporzioni di carne, come in quelli fabbricati esclusivamente con carne di cavallo, e forse ciò dipenderebbe dal fatto che quando il glicogene, come altre sostanze chimiche, hanno superata una certa proporzione, danno qualitativamente reazioni di una sensibilità poco differenziabile.

Mi sono ancora proposto di ricercare se le sostanze le quali vengono aggiunte alle salsiccie dai diversi fabbricatori o per conferire ad esse un gusto ricercato ed appetitoso, o per dare un aspetto o colorito voluto, od infine per lo scopo di ottenerne una buona conservazione, possono disturbare la reazione.

Perciò feci aggiungere nella voluta misura alla pasta di alcuni dei salami dei miei esperimenti le diverse concie in uso nel mercato di Padova, ad altri nitrato di potassio ad altri infine acido borico ed acido salicilico nelle proposizioni di 1 e 2‰.

Trascurai l'aggiunta di amido il quale, come già a priori si capisce e molti autori hanno dimostrato, disturba la reazione. Gli stessi autori hanno poi, in modo completo, indicato il modo col quale si può agire nel caso che il microscopio ne indichi la presenza, e cioè di fare l'infuso a freddo e poi filtrare o aggiungere acido acetico.

La durata e la entità della reazione nelle salsiccie, alle quali vennero aggiunte tali sostanze, non fu in generale differente che in quelle in cui la pasta era stata confezionata coll'aggiunta di solo piccola quantità di pepe o di sal di cucina.

Solo ho potuto notare una durata maggiore di 5 o 6 giorni in alcune delle salsiccie alle quali era stato aggiunto dell'acido borico.

Alcuni dei salami sottoposti all'esperimento, e precisamente quelli della prima serie, furono mantenuti in un locale fresco e piuttosto asciutto, mentre quelli della seconda e terza serie furono conservati in un locale caldo e molto ventilato. In tal modo il prosciugamento dei primi fu molto più lento che quello dei secondi, essendo la quantità percentuale di acqua nei primi diminuita in 40 giorni da 70 circa % a 35-40 %, mentre nei secondi si ebbe la

diminuzione nello stesso periodo da 70<sup>0</sup>/<sub>100</sub> a 25<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. Per determinare la quantità di acqua io esponevo prima a bagno maria e poi nella stufa, a 100° per 3 ore un dato peso di pasta finamente tagliuzzata, pesando anche dopo l'operazione sempre in capsula tarata.

Qualcuno dei salami da me esaminati, per la presenza nel loro interno di qualche notevole isola di aria, non espulsa durante la confezione, andò rapidamente in preda alla putrefazione; in questi la reazione scomparve con eguale rapidità.

Altri si copersero di muffe e tra questi molti di quelli che erano stati confezionati esclusivamente con carne di cavallo, altri infine si trovarono, al momento dell'esame, in preda all'irrancidimento. In questi stati non ho potuto constatare mai la presenza del glicogene.

Riassumo nelle tabelle seg. i risultati delle mie ricerche.

TABELLA I. — 1<sup>a</sup> Serie — Salsiccia fabbricate nel giorno 27 marzo 1901 con aggiunta di pepe e cloruro di sodio.

DATA dell'esame	Giorni dalla confezione	Quantità di carne equina contenuta	Acqua 0/100	REAZIONE	Stato di conservazione
1 Aprile. . . . .	4	tutto cavallo	62.1	Rosso bordeaux .	Ottimo.
4 id. . . . .	8	id.	—	id.	id.
id. . . . .	8	un quarto	—	id.	id.
id. . . . .	8	un nono	—	Violetto . . . . .	id.
8 id. . . . .	12	una metà	50.3	Rosso bordeaux .	id.
11 id. . . . .	16	id.	39.14	id.	id.
id. . . . .	16	tutto cavallo	65.00	id.	id.
14 id. . . . .	19	un quarto	—	Negativa . . . . .	Putrefazione di una parte.
15 id. . . . .	20	un nono	52.0	Rosso bordeaux .	Ottimo.
22 id. . . . .	27	tutto cavallo	36.0	Negativa . . . . .	Buono.
25 id. . . . .	30	una metà	48	Rosso bordeaux pallido . . . . .	Buono.
30 id. . . . .	35	id.	42	Negativa . . . . .	id.

In seguito la reazione manca costantemente.

TABELLA II — 2.<sup>a</sup> Serie — Salsiccie fabbricate nel giorno 9 Novembre 1901.

DATA dell'esame	Giorni dalla confezione	Quantità di carne equina contenuta	Sostanze aggiunte	Acqua 100	Reazione del glicogene	Stato di conservazione
18 Novembre .	9	una metà	Pepe Cloruro di sodio e varie droghe	69.2	Rosso bordeaux	Buono.
19 id. .	10	id.	id.	—	id.	id.
21 id. .	12	id.	id.	—	id.	id.
24 id. .	15	id.	id.	—	id.	id.
26 id. .	17	id.	id.	—	id.	id.
27 id. .	18	id.	id. con acido borico al 100	—	id.	id.
id. .	18	id.	id. con acido salicilico all'1000 . . .	—	id.	id.
id. .	18	id.	Pepe, sale, droghe. . . . .	—	Negativa . .	Putrefazione.
29 id. .	20	id.	id.	46.47	Rosso bordeaux	Buono.
id. .	20	un quinto	id.	20.13	id.	id.
6 Dicembre .	26	una metà	id.	42.8	id.	id.
id. .	26	id.	id. nitrato di potassio . .	45.3	id.	id.
10 id. .	32	id.	id.	40.3	Negativa . .	Irrancidimento.
id. .	32	tutto cavallo	Pepe, sale, droghe . . . . .	39.7	id.	Ammuffimento.
16 id. .	36	una metà	id.	20.4	Violaceo pallido	Buono.
20 id. .	42	id.	id.	26.2	Rosso bordeaux	id.
25 id. .	47	id.	id.	—	Negativa . .	id.
31 id. .	53	id.	id. con acido borico . . .	27.2	Violaceo pallido	id.
id. .	53	id.	Pepe, sale droghe. . . . .	—	Negativa . .	id.
2 genn. 1902.	55	un quinto	id.	30.3	id. . .	id.
10 id. .	63	una metà	id. con nitrati	34.5	id. . .	id.

Nei seguenti esami la reazione manca costantemente.

TABELLA III — 3.<sup>a</sup> Serie — Salsiccie fabbricate nel giorno 29 novembre 1901. — Cavallo e maiale a parti eguali — Aggiunta di pepe e sal di cucina.

DATA	Giorni dalla confezione	Acqua 0/10	REAZIONE	Stato di conservazione
1 Dicembre 1901	3	68,95	Rosso bordeaux	Buono.
6 id.	8	65,32	id.	id.
10 id.	12	64,3	id.	id.
14 id.	16	50,41	id.	id.
18 id.	22	45,76	id.	id.
21 id.	28	45,79	id.	id.
31 id.	35	29,7	id.	id.
12 Gennaio 1902	47	26,3	Violaceo pallido	id.
18 id.	53	25,7	id.	id.
22 id.	57	25,9	id.	id.
25 id.	60	26,1	Negativa	id.

Negli esami posteriori la reazione mancò costantemente.

Dal fin qui esposto possiamo concludere:

1.° Che la reazione del glicogene si può ritenere costante nella carne di cavallo, qualunque sia stata la causa della morte.

2.° Che essa si riscontra nelle salsiccie fabbricate con carne di cavallo anche se questa vi si trova in minime proporzioni.

3.° Non pare che sia notevolmente influenzata dal contenuto di acqua o dalle sostanze che si aggiungano alle salsiccie a scopo di conservazione, pur dovendo riconoscere che essa ha persistito alquanto di più in qualcuno dei salami che contenevano acido borico ed in quelli che si erano più rapidamente prosciugati.

4.° Persiste anche per un periodo di 40, 45 o 50 giorni e fino a 57 giorni in qualche caso.

. . .

Ma la sola reazione del glicogene può indurci nella sicurezza di trovarsi di fronte a carne di cavallo?

Nei lavori più innanzi citati si rileva come, mentre Courtoy e Corremand e Battelli affermano mancare nella carne bovina e suina tale reazione da loro trovata evidentissima in quella equina, Niebel invece alla sua volta dimostra che nella carne di cavallo la quantità di glicogene è solamente maggiore di quella della carne di bue, dove esso non manca e nella quale anche Bastien in seguito lo trovò dimostrabile solo in determinati muscoli.

I risultati di coloro che ritengono che il glicogene manchi costantemente in altre carni che non siano quelle di cavallo, non concordano precisamente con ciò che la fisiologia insegna; poichè noi sappiamo che se il glicogene abbonda costantemente nel fegato, esso però non manca negli altri organi e specialmente, quantunque in minori proporzioni, si trova anche nei muscoli come Cl. Bernard per primo nel 1859 ha dimostrato ed altri dopo di lui hanno confermato.

Ora, già considerando i diversi risultati degli autori succitati viene alla mente l'altro insegnamento della fisiologia, che la quantità di glicogene dei muscoli è influenzata dai vari stati dell'organismo, come il lavoro, l'inanizione etc. Inoltre, dopo un pasto ricco di idrati di carbonio, la quantità di glicogene del fegato aumenta, ma arrivata ad un certo limite il glicogene passa nei muscoli dove viene immagazzinato.

Ecco le ragioni per le quali a priori non si può escludere che anche altre carni di quelle che vengono spacciate fresche per l'alimentazione o mescolate a quelle suine per la confezione delle salsiccie, possano dare la reazione del glicogene.

Per persuadermi di ciò e concorrere così anch'io alla

rispettiva dimostrazione, mi sono procurato dei campioni di carne di bue, staccandoli io stesso dai *quarti* di buoi appena uccisi, ed ebbi i risultati seguenti, sempre praticando la prova col metodo più innanzi descritto:

1	Marzo	1901.	Carne di	coscia	di	bue	—	reaz.	negativa
2	Nov.	»	»	»	»	»	—	rosso	bord.
3	»	»	»	»	»	»	—	»	»
16	Dic.	»	»	di	spalla	»	—	»	»
1	Genn.	1902.	Carne	di	petto	»	—	»	»
7	»	»	»	»	»	»	—	»	»
8	»	»	»	»	»	»	—	»	»

Su otto campioni di carne di bue fresca, ebbi adunque la reazione in 7 di essi, cioè oltre l'87 % delle volte.

Mi sono proposto allora di studiare il fenomeno più da vicino, dosando la quantità di glicogene contenuta nella carne di cavallo in confronto colla carne di bue e studiare se nel bue si possano avere variazioni nella quantità a seconda della alimentazione.

Perciò ho fatto alimentare per un periodo di 10 giorni 2 buoi destinati alla macellazione con barbabietole da zucchero finamente tagliate e mescolate a poco fieno. Gli animali così mantenuti mangiarono volentieri tal cibo, ciò che è oramai notorio tra gli agricoltori, i quali vanno ogni giorno più persuadendosi del valore delle barbabietole come foraggio e non trascurano anche i cascami di queste rifiutati dalle fabbriche di zucchero. Da questi due buoi subito dopo la macellazione staccai un pezzo di due muscoli omologhi al petto ed al fianco.

In tale carne ed in una corrispondente quantità di carne di altro bue, venuto al macello dopo di essere stato alimentato nella stessa stalla col comune foraggio, ed in un pezzo di carne di coscia di cavallo, abbattuto al macello per frattura di una spalla, io determinai la quantità di glicogene contenuta per più giorni di seguito.

La ricerca quantitativa del glicogene ha formato in questi ultimi tempi oggetto di studio essendosi riconosciuta la facilità con cui il glicogene durante lo svolgersi dell'esperimento viene ad essere trasformato (1).

Il metodo che per primo venne indicato e che, malgrado molte lievi modificazioni proposte, gode la fiducia dei più, è quello di Brùke e Külz. Dopo tutti i lavori fatti nel laboratorio di Külz e di Pflüger pare che il metodo suaccennato possa aver qualche difetto nel senso che o la

---

(1) Vedansi a questo proposito i seguenti lavori: Lebbin — *Zur quantitativen Bestimmung von Glikogen (Vorläufige Mitteilung) Pharm. Zeitung*, 1898, N. 43, S. 519 — Jos. Weinbaum — *Zur quantitativen Bestimmung des Glykogens — Pflüger's Archiv ges. Physiologie*, 1899, N. 75, S. 113-119 — E. Pflüger — *Die Bestimmung des Glykogens nach Brùke und Külz — Pflüger's Archiv ges. Physiologie*, 1899, N. 75, S. 120-247 — Pflüger und Nerking — *Eine neue methode zur Bestimmung des Glykogens — Pflüger's Archiv*, 1899, N. 76, S. 531-540 — E. Pflüger — *Bemerkungen zu der vorstehenden Abhandlung über eine neue methode zur Bestimmung des Glykogens — Pflüger's Archiv*, 1899, N. 76, S. 543-551 — G. Brenstedt — *Ueber Isolirung von Glykogen aus Pferdefleisch und Fleischpreparate — Arch. Pharm.*, 1899, N. 237, S. 637-649 — A. Gautier — *Darstellung und Bestimmung des Glykogens — Compt. rend.*, 1899, N. 129, pag. 701-705 — A. Desgrez — *Die Bestimmung des Glikogens — Bull. sciences pharmacol.*, 1900, N. 2, pag. 207-212 — E. Bendix e I. Wohlgemuth — *Ueber Reindarstellung des Glykogens — Pflüger's Archiv.*, 1900, N. 80, S. 233-240 — E. Pflüger — *Die Bestimmung des Glykogens nach E. Austin — Pflüger's Archiv.*, 1900, N. 80, S. 351-369 — E. Pflüger — *Die quantitative Bestimmung des Glykogens nach der methode von Pflüger und Nerking in Lichte de L'here von E. Salkowski — Pflüger's Archiv.*, 1900, N. 81, S. 1-7 — J. K. Hagwood — *Ueber die Bestimmung des Glykogens und der Gehalt verschiedener Theile des Fleisches des Pferdes an Glykogen — Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1900, N. 22, S. 85-93 — S. Lebbin — *Ueber ein neues Verfahren zur quantitative Bestimmung des Glykogens — Zeitschr. öffentl. Chemie*, 1900, N. 6, S. 325-327 — I. Mayrhofer — *Ueber die quantitative Bestimmung des Glykogens und Stärke in Vürst und Fleischwaren — Zeitschr. f. Untersuchung. d. Nahrungs und Genussmittel*, 1901, S. 1101 — (Per tutti i lavori citati in questa nota Vedi: *Zeitschr. f. Untersuchungs der Nahrungs und Genussmittel*, Jahrgang, 1899, 1900, 1901).

potassa stessa o la prolungata cottura possano influire alterandone la quantità o pare che l'una agisca in senso inverso dell'altra, la prima scomponendo la sostanza ricercata e la seconda mettendolo in libertà dai suoi legami più stabili (1).

Io, dato il carattere comparativo della mia speciale ricerca, ho usato senz'altro il metodo di Brücke e Kulz con una lieve variazione alla quale accennerò, mantenendo per tutte le prove scrupolosamente le stesse condizioni, per evitare tutte le cause di errore.

Così, dopo di avere tagliuzzato e ridotto in poltiglia un pezzo di carne, e di averlo liberato dalle parti tendinose e dal grasso, ne pesavo 20 grammi e li mettevo in un bicchiere con 50 gr. di acqua. Con una soluzione di potassa al 20% rendevo il liquido nettamente alcalino (Brücke e Kulz invece mettono la carne nella soluzione di potassa al 2%).

La bollitura veniva fatta esponendo il bicchiere alla fiamma su rete metallica, con poca lana di amianto, e con continua sorveglianza veniva prolungata per 3 ore.

Dopo raffreddamento si filtrava per una tela accuratamente lavata spremendo fortemente il residuo.

Quindi il liquido filtrato si acidificava con acido cloridrico concentrato e si aggiungeva il reattivo di Mayer in lieve eccesso.

Si filtrava di nuovo per filtro rinforzato e dopo di avere lavato con poca acqua il residuo, lo si spremeva ancora.

Da ultimo nel liquido limpido si aggiungeva il doppio volume di alcool a 96° e si lasciava precipitare il glicogene. Dopo 12-16 ore si filtrava per filtro tarato e si lavava il glicogene prima con alcool assoluto, poi con etere

---

(1) Nerking — *Beiträge zur Physiologie des Glykogens* — *Pflüger, Archiv.*, 1900, N. 81, S. 8-71.

e da ultimo di nuovo con alcool. Dopo esposizione del filtro per mezz' ora alla stufa a 100°, si pesava.

I risultati vengono riassunti nella seguente tabella, nella quale, accanto alla percentuale di glicogene viene segnato il grado della reazione ottenuta coll'iodio sul brodo fatto col metodo ordinario colla stessa carne.

BUOI NUTRITI CON BAREBIETOLE						BUE NUTRITO COL COMUNE FORICGIO			CAVALLO		
Ore e giorni dalla morte	Grammi di glicogene su 100 gr. di carne	Reazione colla soluzione di iodio	Ore e giorni dalla morte	Grammi di glicogene 0/0	Reazione colla soluzione iodica	Ore e giorni dalla morte	Grammi di glicogene 0/0	Reazione colla soluzione iodica	Ore e giorni dalla morte	Grammi di glicogene 0/0	Reazione colla soluzione iodica
mezz'ora	0.3135	Rosso bord	2 ore	0.6105	Rosso bord	2 ore	0.385	Rosso bord	—	—	—
20 ore	1.384	id.	20 ore	1.1961	id.	20 ore	0.61	id.	20 ore	0.8210	Rosso bord
40 ore	1.17	id.	40 ore	1.2230	id.	48 ore	0.25	id.	48 ore	0.4710	id.
96 ore	0.676	id.	84 ore	0.9685	id.	96 ore	0.05	id.	95 ore	0.321	id.
7 giorni	0.2665	id.	7 giorni	0.3885	id.	7 giorni	0.06	id.	7 giorni	0.0515	id.
10 id.	0.063	Violetto	10 id.	0.2535	Violetto	9 id.	0.013	Violetto	10 id.	0.021	Violetto
14 id.	0	Negativa	11 id.	0.005	id.	12 id.	0	Negativa	12 id.	0.031	id.
			15 id.	0	Negativa				14 id.	0	Negativa

Come facilmente si può rilevare dalla tabella, la quantità di glicogene da me riscontrata è generalmente maggiore nei due buoi alimentati con barbabietola, che nell'altro bue alimentato col comune foraggio e che nello stesso cavallo ucciso.

In secondo luogo la quantità di glicogene contenuta nella carne subisce variazioni secondo il tempo passato dal momento della morte, e cioè aumenta da mezza ora dopo la morte fino a 20 ore per poi diminuire fino alla scomparsa entro 10-12 giorni.

Al fatto dell'aumento dopo le prime ore dalla morte, la cui ragione a me per ora non è nota, contribuisce forse la perdita di acqua che la carne fa nel primo tempo, ed alla frollatura che in seguito avviene ed alla successiva putrefazione si deve certo la diminuzione successiva e la definitiva scomparsa.

Siccome adunque risulta che la qualità di alimentazione ha una sicura influenza sul contenuto di glicogene nei muscoli di bue, così è da supporre che le stagioni, colle quali varia da una parte l'alimentazione e dall'altra il grado di fatica, possono alla loro volta influire indirettamente sulla ricchezza di glicogene nei muscoli di tali animali e che a questo si debba appunto la differenza dei risultati dei vari analizzatori.

∴

Già nella prima parte della mia ricerca, erami risultato che nelle salsiccie le quali, per difetto di preparazione, o erano state invase da muffe, oppure si erano alterate in parti centrali, od anche irrancidite, la reazione era venuta a mancare molto tempo prima che in quelle, nelle quali non si era potuta notare alterazione nello stato di conservazione, sebbene esse contenessero una discreta quantità percentuale di carne di cavallo o fossero di questa esclusivamente confezionate

Questo fenomeno dovuto alla trasformazione che il glicogene subisce durante i processi che producono la putrefazione certo si deve ascrivere agli agenti stessi di questa. Per cui io ho voluto ricercare se tra i microorganismi che si possono trovare nelle salsiccie, qualcuno ve ne fosse che nel glicogene avesse una speciale azione, o se invece tale azione fosse diffusa a tutti i microorganismi o se questi la spiegassero solo in condizioni di simbiosi.

Già Chovvin et Dissart (1) nel 1893 avevano visto che il *bacillo piociano* nelle colture può vivere a spese del glicogene trasformandolo in glucosio; e Roger (2) coltivando il *bacillo del carbonchio* in brodi contenenti glicogene, ha trovato che lo fa scomparire rapidissimamente.

Etienne (3) mise a sviluppare nel brodo di fegato e nel brodo coll'aggiunta di glicogene, vari microorganismi patogeni e trovò che il glicogene non veniva alterato dallo *streptococco*, dagli *stafilococchi bianco ed aureo*, dal *bacillo di Friedländer*. Il *coli bacillo* aveva su di esso una azione talvolta riducente e talvolta no, il *bacillo del tifo* e quello del *carbonchio ematico* lo trasformavano.

Io per risolvere alla mia volta il quesito propostomi, ho innanzitutto isolato i germi contenuti nelle mie salsiccie nei diversi periodi della trasformazione del glicogene. L'isolamento venne da me fatto col metodo usato dal Prof. Serafini nel suo lavoro sulle carni insaccate (4).

---

(1) Charrin et Dissart — *Les propriétés du B. pyocyaneum en fonctions des qualités nutritives du milieu* — *Soc. de Biologie* 1893. Mémoires, pag. 183.

(2) Roger — *Recherches sur les variations de la glycogène dans l'infection charbonneuse* — *Arch. de physiologie*, 1894, pag. 64.

(3) Etienne — *Action de quelques microbes sur la substance glycogène* — *Soc. de Biologie*, 1894, pag. 750.

(4) Serafini — *Analisi chimico-batteriologica di alcune carni insaccate* — Contribuzione allo studio delle conserve alimentari — *Atti della R. Accademia medica di Roma*, Anno XVI, Vol. V, Serie II.

Dopo di avere raschiata la superficie esterna dei salami, verso la parte mediana della lunghezza, la bruciavo circolarmente con un coltello arroventato. Dopo ciò, con un altro coltello sterilizzato alla fiamma tagliavo la saliccia in due metà, e con un terzo coltello, pure sterile, togliendo i pezzetti più superficiali, mettevo allo scoperto una parte più profonda non toccata dal taglio. Dopo ciò con una pinza sterile distaccavo i pezzetti più profondi e li facevo cadere in provette di brodo sterile. Di questi pezzetti alcuni erano tolti nella parte assiale ed altri in quella periferica del salame. Quindi, dei tubi di brodo, avendo cura di esporne prima alcuni alla temperatura di 100° per 15 minuti, si facevano, dopo accurata agitazione, colture isolanti in agar e gelatina. Delle piastre in agar, alcune si mettevano a sviluppare in atmosfera di idrogeno nell'apparecchio di Botkin. Altri dei tubi di brodo coi pezzettini di carne, si chiudevano sotto idrogeno per isolare col metodo di Kitasato, i microorganismi anaerobi sporigiferanti.

A completo sviluppo delle colonie nelle piastre, procedevo all'esame diagnostico di ciascuna di esse, ed inoltre seminavo i microorganismi isolati in brodo di cavallo o di bue che davano la reazione del glicogene.

Li seminavo inoltre in un liquido nutritivo così composto:

Glicogene purissimo Merch . . . . .	gr. 2,00
Peptone secco di Witte. . . . .	» 10,0
Cloruro di sodio . . . . .	» 5,0
Fosfato monosodico . . . . .	» 0,15
» bisodico. . . . .	» 0,35
Acqua . . . . .	cc. 1000

Nei tubi così seminati ed esposti alcuni a 22°, altri a 37° ed altri infine lasciati alla temperatura dell'ambiente, procedevo metodicamente alla ricerca del glicogene, col metodo seguente.

In un piattino di porcellana bianca distendevo un piccolo strato di soluzione di iodio iodurata e su questa facevo cadere una goccia di brodo cultura estratta con una grossa ansa di platino sterilizzata. Nel caso di presenza del glicogene, al punto di contatto si formavano rapidamente anelli concentrici del colorito rosso bruno caratteristico.

I microorganismi che io ho in questo modo isolati e provati, furono, in ordine di frequenza i seguenti:

1.° Proteo volgare

2.° Un bacillo coliforme

3.° Micrococco luteo

4.° Uno streptococco (probabilmente lo *streptococcus coli gracilis* di Escherich).

Quest'ultimo ed il secondo furono i soli a presentarsi nelle colture anaerobiche.

Coll'esame metodico delle colture di questi microorganismi, fatto col metodo che sopra descrissi non ho potuto riscontrare la scomparsa del glicogene neppure dopo 4 mesi di contatto.

Così non ho potuto riscontrare la scomparsa della reazione cogli altri germi del vivaio di questo Istituto, patogeni o no.

Essi furono:

Il bacillo del carbonchio ematico, gli stafilococchi aureo, albo e citreo, il bacillo del colon e quello del tifo, il bacillo della difterite, la sarcina lutea.

Non so a che ascrivere la differenza dei miei risultati riguardo ai bacilli del tifo e del carbonchio da quelli del Roger e dell'Etienne. Solo posso notare che la coltura del bacillo tifico da me usata si trovava da molto tempo nel vivaio, e quantunque di provata vitalità, non mi era nota la sua virulenza. Il bacillo del carbonchio invece era di notevole virulenza e capace di uccidere in 20 ore un coniglio di gr. 1500.

Invece ebbi qualche volta la rapida scomparsa del

glicogene nelle colture impure di più microorganismi ottenuta col mettere nel brodo glicogenato uno dei pezzetti di carne tolti dalle salsiccie. Così potei notarne la scomparsa in una coltura dove avevo seminato il bacillo di Loeffler e che poi all'esame microscopico si mostrò inquinata da cocchi.

Quindi in conclusione di questo posso finora asserire che nelle colture artificiali aerobiche ed anaerobiche il glicogene contenuto nel brodo non vien in genere ridotto dai vari microorganismi separatamente, ma che scompare invece nelle colture di più microorganismi, dimostrando così che tal fenomeno è dovuto con probabilità a fatti di simbiosi. Su questo speciale riguardo però veggo necessarie altre ricerche che mi propongo di continuare.

### Conclusioni.

Riassumendo quanto ho esposto nelle diverse parti di questa mia ricerca, posso concludere:

1.° che la reazione del glicogene si riscontra costantemente nella carne di cavallo qualunque sia la causa che ne abbia prodotta la morte;

2.° Che essa non manca nelle salsiccie confezionate e adulterate con carne equina e non pare notevolmente influenzata né dalla quantità percentuale della carne, né dalle sostanze che, per vari scopi, si mescolano alla pasta delle salsiccie;

3.° Che nelle salsiccie può durare un tempo abbastanza lungo, 50-51 giorni e che alla maggior durata può contribuire il rapido essiccamento della pasta e l'aggiunta in essa di acido borico;

4.° Che nella carne di bue il quantitativo di glicogene per causa di speciale alimentazione, può notevolmente aumentare fino a superare quello stesso della carne di cavallo, ciò che può avvenire in quelle stagioni nelle quali ai buoi si somministrano o barbabietole da foraggio o barbabietole da zucchero od i cascami di queste;

5.° La scomparsa della reazione del glicogene nelle salsiccie pare dovuta a fenomeni di simbiosi di diversi microorganismi.

Ora la mia conclusione relativa al contenuto di glicogene nella carne di bue può assumere in pratica notevole importanza per scuotere maggiormente innanzi al magistrato il valore del metodo esaminato, il quale già è riconosciuto insufficiente allorchè la carne è insaccata da parecchi mesi. Giacchè se è vero, come risulta anche dalla mia ricerca, che la carne di maiale, colla quale per lo più si fanno salami e salsiccie, non contiene tanto glicogene da essere sensibile alla reazione coll'iodio, è pur vero che spesso e specialmente in determinate circostanze d'alimentazione può contenerne anche quella del bue. Ora se l'art. 108 del regolamento generale 3 febbraio 1901 della legge sanitaria indica come adulterate a senso dell'art. 62 della legge i prodotti alimentari « *mescolati a materie di qualità inferiore* », il perito della difesa, non essendovi altri sicuri criteri differenziali, potrebbe sostenere trattarsi non di aggiunta di carne equina o di gatto o di cane o di feto, ma di buona carne bovina che non è certo di qualità inferiore a quella suina.

Nè si potrebbe invocare per i salami l'altra parte del suddetto articolo 108, cioè che sono da considerarsi come adulterati i prodotti alimentari « comunque trattati in modo da variarne la composizione naturale », perchè i salami sono prodotti confezionati e non è detto che debbano essere confezionati *naturalmente* con carne suina, a meno che non siano esplicitamente venduti come fatti di sola carne di maiale.

Dall'Istituto d'Igiene della R. Università di Padova diretto dal Prof. A. SERAFINI. Giugno 1902.

Estratto dal Periodico *Le Stazioni sperimentali agrarie italiane*, 1902  
Vol. XXXV, Fasc. VI, dalla pag. 417 alla pag. 440

31292







Due Direzione del Giornale

Il Policlino

Corso Umberto I°  
Angelo Caravita

Prima